10 月 October
2019, 62(10): 1186 – 1196
昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: //www. insect. org. cn
doi: 10.16380/j. kcxb. 2019.10.007

乐果对家蚕生殖腺及氧化应激反应的影响

石　敏, 李冠楠, 郑　茜, 刘凤丹, 赵　珊, 蔡　苗, 朱　勇*

(西南大学生物技术学院, 农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715)

摘要:【目的】农药施加不当导致环境污染严重,已成为蚕桑业发展面临的紧迫问题。本研究旨在评估大田喷洒有机磷农药乐果污染间作桑园可能导致对家蚕 *Bombyx mori* 正常发育的影响,以分析乐果对家蚕生殖腺的毒理损伤影响。【方法】以文献报道的乐果对家蚕幼虫的 LD_{50} 为 400 mg/L 作为参考依据,给家蚕 5 龄幼虫添食不同浓度(0, 50, 100, 200 和 400 mg/L)乐果溶液浸叶处理的桑叶,测定乐果处理后 5 龄幼虫茧质和体重,雌、雄幼虫生殖腺中乐果残留含量和 H_2O_2 含量,抗氧化酶(SOD 和 CAT)活性及其 mRNA 表达。【结果】结果显示,乐果处理后家蚕 5 龄幼虫茧质和体重以及雌、雄幼虫生殖腺中乐果残留含量均具有浓度-效应关系。100 ~ 200 mg/L 乐果浓度添食下,雌雄幼虫生殖腺中 H_2O_2 含量与对照(清水)相比均显著上升。随着添食浓度的增加,SOD 和 CAT 活性都出现先降低后升高的趋势,但均低于对照组。*sod* 和 *cat* 的 mRNA 表达水平与相应的酶活性具有正相关性。通过 HE 染色以及生精囊的体外培养,观察到在乐果处理后雌、雄幼虫生殖腺的形态结构发生变化,表现为形态畸形,细胞内空泡增大,生殖细胞数目相对减少,且随浓度的增加,生殖腺损伤越严重。【结论】本研究结果说明,采用乐果对家蚕的 LD_{50} 以下浓度溶液浸叶添食于 5 龄幼虫,对家蚕生殖腺发育有毒理损伤的影响,这为从蚕业生产角度全面禁止大田使用乐果和加强农业生产区划管理提供了依据。

关键词: 家蚕; 乐果; 生殖毒性; 氧化应激; 形态结构

中图分类号: Q965.9　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2019)10-1186-11

Effects of dimethoate on the gonads and oxidative stress response in the silkworm, *Bombyx mori*

SHI Min, LI Guan-Nan, ZHENG Xi, LIU Feng-Dan, ZHAO Shan, CAI Miao, ZHU Yong* (State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract:【Aim】Due to improper application of pesticides, environmental pollution has become an important obstacle to the development of sericulture. This study aims to assess the effects of field application of the organophosphorus pesticide dimethoate on the silkworm, *Bombyx mori*, so as to elucidate its damage mechanism to the gonads of this insect.【Methods】According to the LD_{50} value of dimethoate to *B. mori* larvae (400 mg/L) reported in the literature, the 5th instar larvae of *B. mori* were fed with mulberry leaves that had been soaked in different concentrations (0, 50, 100, 200 and 400 mg/L) of dimethoate solution. After treatment with dimethoate, the cocoon quality and body weight of the 5th instar larvae, and the residual content of dimethoate and the H_2O_2 content, the activities of antioxidant enzymes and the mRNA expression levels of these enzymes in the gonads of both male and female larvae were determined.【Results】The results showed that the cocoon quality and body weight of the 5th instar

基金项目: 重庆市商务委项目家蚕抗 NPV 品种"渝蚕 3 号"示范与推广研究(CQ2019JSCC06)
作者简介: 石敏, 女, 1995 年 6 月生, 重庆垫江人, 硕士研究生, 研究方向为家蚕遗传与家蚕毒理学, E-mail: 1650929122@qq.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: zhuy@swu.edu.cn
收稿日期 Received: 2019-04-24; 接受日期 Accepted: 2019-07-25

larvae of *B. mori* and the residual content of dimethoate in the gonads of both female and male larvae after treatment with dimethoate showed the concentration-effect relationship. The H_2O_2 content in the gonads of both female and male larvae treated with 100 – 200 mg/L dimethoate significantly increased as compared with that in the control (treated with water). With the increase of the concentration of dimethoate, both SOD and CAT activities showed a trend of decreasing first and then increasing, and both of them were lower than those in the control group. And there was a positive correlation between the SOD or CAT activity and the mRNA expression levels of the corresponding gene. After HE staining and *in vitro* culture of the spermatogenic sac of the silkworm, the morphological structure of gonads in male and female larvae after treatment with dimethoate showed obvious change, with their morphology abnormal, intracellular vacuoles increased, and the number of germ cells reduced relatively. Besides, with the increase in the concentration of dimethoate, its damage to gonads became more serious. 【Conclusion】 The results of this study suggest that using leaves that have been soaked in dimethoate solution at a concentration below LD_{50} to feed the 5th instar larvae of *B. mori* have toxic effects on the development of gonads of *B. mori*, and this provides a basis for banning the use of dimethoate in the field and strengthening the regional management of agricultural production.

Key words: *Bombyx mori*; dimethoate; reproductive toxicity; oxidative stress; morphological structure

乐果(dimethoate, DMT)(分子式：$C_5H_{12}NO_3PS_2$)是一种用途广、产量大、易挥发的中等毒性、内吸性有机磷杀虫剂、杀螨剂，具潜在致癌、致畸和致突变作用，主要用于防治桑瘿蚊、桑尺蠖 *Phthonandria atrilineata* 等(刘洋和陈永娟，2016；王守敏等，2016；张鹏鹏等，2016；覃明丽等，2017)。研究表明，乐果农药被认定为一种环境激素，在很低剂量也会干扰动物的生长发育、繁殖或激素的合成代谢(吕林兰等，2014)。乐果进入动物体内后能迅速降解为氧化乐果(OMT)，造成神经生理功能紊乱，严重影响动物健康，并且降解速度较慢(吴燕等，2014)。乐果能影响动物全身脏器，并能抑制中枢神经系统和呼吸中枢，导致呼吸衰竭严重致死(肖彦春等，2016；涂向阳等，2000)。

汪敏(2017)和 Valenzuela-Harrington 等(2012)研究表明，乐果能破坏小鼠的肝细胞和运动机能，并影响学习和记忆能力。Wilczeka 等(2014)研究表明乐果能使狼蛛 *Xerolycosa nemoralis* 肠腺体细胞凋亡或坏死程度增加。Abdallah 等(2010)和陈建秋等(2012)研究显示乐果对动物生殖有一定干扰作用，影响器官发育与性成熟时间并影响后代发育。王春花等(2015)表明低剂量乐果对秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 内禀增长率具有毒物兴奋效应，而高剂量乐果短时间可使线虫种群的内禀增长率受抑制。乐果使用后的残留超标风险主要源于其增毒代谢物氧化乐果(王新全等，2017)。路志芳等(2015)研究表明小麦籽粒中的乐果残留超标率较高。

家蚕 *Bombyx mori* 属于鳞翅目昆虫，是我国重要的经济昆虫，在农业生态系统和经济中占有重要地位。但是家蚕经过人类长期的驯化，抗毒抗逆性功能逐渐退化。桑园或附近农田由于农药施加不当导致的家蚕中毒事件频繁发生，已成为蚕桑产业发展需要解决的紧迫问题(韦炳佩等，2015；唐文超等，2016)。目前大田施放乐果农药污染桑叶影响家蚕的毒性安全评价研究较少，对家蚕食下乐果污染的桑叶是否影响虫体正常生长发育的毒理损伤也鲜有报道。本研究选用家蚕作为受试对象，基于40%乐果乳油用于大田喷雾一般需要稀释700～800倍、李华英等(2010)用乐果防治桑树害虫的浓度(40%乐果乳油稀释1 000倍)以及其在家蚕食桑后的乐果残毒期作为为参考依据，根据张晶等(2016)报道乐果对家蚕的 LD_{50} 为400 mg/L，采用浸叶法在其 LD_{50} 以下浓度范围设计浸泡桑叶的乐果溶液浓度分别为0，50，100和200 mg/L。通过浸泡不同浓度乐果溶液的桑叶，经晾干后饲养家蚕5龄幼虫，评估其添食后对家蚕幼虫的存活率、体重、茧质量以及雌、雄生殖腺中乐果残留含量的浓度-效应关系，测定生殖腺超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性以及 H_2O_2 含量的变化，利用组织切片技术和细胞实验分析家蚕食下乐果污染桑叶对生长发育和生殖腺发育的影响，由此探讨有机磷乐果对家蚕的生殖毒性。通过本研究为大田喷洒有机磷乐果农药污染间作桑园可能影响家蚕正常发育

的安全性评估提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

本试验选用家蚕一代杂交种 872 × 871 为实验材料，由重庆市蚕业科学研究院提供。蚕卵在 26 ± 1℃、相对湿度 80% 条件下催青，幼虫在温度 25 ± 1℃、相对湿度 65% ~75%、光周期 12L: 12D 的培养箱中用桑叶饲喂。

1.2 试虫处理及样品准备

乐果(DMT, 40%乳油，重庆市化工集团)用纯水配成 800 mg/L 母液，并用清水分别配制乐果浓度为 0, 50, 100, 200 和 400 mg/L 的溶液备用。采用浸叶法浸入实验药液，浸泡桑叶 1 min，自然晾干。将家蚕 1 -4 龄幼虫用新鲜桑叶正常饲养。从 5 龄幼虫眠起开始，挑选长势均匀的幼虫分区饲养，各区均设 3 个重复组，每组 100 头幼虫，分别添食不同浓度的浸药桑叶，3 次/d。在恒温培养箱中饲育至 5 龄第 5 天随机取幼虫，冰浴条件下解剖获取生殖腺，每区 3 个重复组。取得的生殖腺一部分置于 4% 的多聚甲醛中固定，用于组织切片；另一部分立即液氮速冻，置于 -80℃ 保存，用于总 RNA 的提取和酶活性测定。

1.3 家蚕茧质和体重调查

分别由家蚕 5 龄第 1, 3 和 5 天幼虫的试验组随机挑选 20 头幼虫称量；待试验组幼虫发育至游走期吐丝结茧，吐丝 1 周后通过随机削茧，鉴别蚕蛹的雌雄，获得雌、雄蚕茧各 15 粒，测量全茧量、茧层重，计算茧层率。

1.4 家蚕生殖腺中乐果农药残留测定

采用 ELISA 法检测家蚕生殖腺中乐果残留浓度。参照酶免生物技术研究所的乐果酶联免疫分析(ELISA)试剂盒说明书进行。最后用酶标仪测定各孔 450 nm 处的吸光值。

1.5 家蚕抗氧化酶活性及 H_2O_2 含量的测定

根据制造商的说明，使用酶活性测定试剂盒(苏州科铭生物技术有限公司，江苏苏州)测定家蚕幼虫生殖腺中的 H_2O_2 含量以及 SOD 和 CAT 活性。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测

家蚕幼虫生殖腺提取总 RNA，用核酸分析仪测定其浓度和琼脂糖电泳检测其完整性后，-80℃ 保存备用。根据各样品 RNA 浓度，反转录合成 cDNA，-20℃ 保存备用。引物用 Premier5.0 软件设计(表 1)，并送于生工生物工程(上海)股份有限公司合成。采用 TB Green™ PremixExTaq™ Ⅱ 试剂盒(TaKaRa，中国)荧光定量 PCR 检测各样品中与氧化应激相关的 CAT 和 SOD 基因的 mRNA 转录水平，以 *actin*3 作为内参，每样品重复测定 3 次。基因的表达水平用相对定量的方法，采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算，并利用统计学软件进行单因素方差分析。

表 1 家蚕抗氧化酶基因表达分析所用引物序列

Table 1 Primers used in the expression analysis of antioxidant enzyme genes in *Bombyx mori*

基因 Gene	引物序列(5′-3′) Primer sequences	产物大小(bp) Product size
*actin*3	F: CTGCGTCTGGACTTGGC R: CGAGGGAGCTGCTGGAT	184
sod	F: GTACAGCAGAACTGGGACCACC R: GGCTTGACTAAGGGTAAACACG	127
cat	F: TGAATAAACGCAGCAGCATC R: AACTTCTCCCAAGCGACACG	110

1.7 家蚕生殖腺的组织形态学观察

取添饲浓度为 0, 100, 200 和 400 mg/L 乐果的家蚕 5 龄第 5 天幼虫的生殖腺在 4% 的多聚甲醛中固定 24 h 后，经乙醇逐级脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，做连续切片，厚度为 5 μm，放在摊片机上 40℃ 烘干。再进行二甲苯脱蜡，用苏木精-伊红(HE)染色，中性树胶封片，显微镜(Lacia)观察、拍照。

1.8 家蚕生精囊的体外培养

备选试剂和用具在无菌室内超净工作台上紫外灭菌 30 min，将细胞培养液过滤，然后配制含有 10% 胎牛血清的细胞培养液。选取添饲浓度为 0, 100, 200 和 400 mg/L 乐果的 5 龄第 4 天的雄性幼虫，每组 3 个重复。在无菌操作台中，先用 75% 酒精浸泡表面，生理盐水中洗涤，然后在冰上解剖取出生殖腺。用生理盐水洗涤 3 次。再转移到装有培养液的培养皿中，撕裂生殖腺外膜，使内容物流出除杂质，用移液器反复吹打收集在离心管静置 10 min 后，吸取底部含精巢的培养液，在 24 孔细胞培养板中加入含 250 μL 的培养液，在外周孔加入适量的灭菌水，在 25℃ 5% 的 CO_2 培养箱中培养。每 24 h 在倒置显微镜下拍照记录一次。

1.9 数据处理

数据分析采用 EXCEL 2010 和 SPSS 17.0 进行统计学分析，处理组与对照组之间的差异采用 Tukey 氏检验进行多重比较，以 0.05 作为显著性水平。依据 3 次生物学重复试验的数据，进行 mRNA 定量检测和酶活性测定的数据分析。

2 结果

2.1 乐果对家蚕茧质和体重的影响

家蚕的全茧量和茧层量随乐果处理浓度的增加而降低，呈现浓度-效应关系，且雌性和雄性间趋势变化相似（表 2）。相比对照组，雌性的全茧量和茧层率在 50 ~ 200 mg/L 乐果处理组出现极显著（$P<0.01$）下降，茧层量在 50 mg/L 处理组无显著性差异（$P>0.05$），在 100 ~ 200 mg/L 处理组出现极显著性（$P<0.01$）下降。相比对照组，雄性的全茧量在 50 mg/L 处理组无显著性下降（$P>0.05$），在 100 mg/L 处理组为显著性下降（$P<0.05$），而在 200 mg/L 处理组极显著下降（$P<0.01$）。乐果不同浓度处理组对茧质的这 3 项数量性状有显著影响，但其影响在雌雄之间存在差别。

如图 1 所示，在各处理浓度中，家蚕幼虫体重随着饲养时间而增加，而同一时间点处理组与对照组比较显示，处理组体重随添食浓度升高而降低；50 ~ 200 mg/L 处理组与其对照组（0 mg/L）均有极显著性差异（$P<0.01$）。结果表明乐果对家蚕 5 龄幼虫发育的体重增加有显著的影响。

表 2 乐果对家蚕茧质的影响

Table 2 Effect of dimethoate on the cocoon quality of *Bombyx mori*

性别 Sex	乐果浓度(mg/L) Dimethoate concentration	全茧量(g) Cocoon weight	茧层量(g) Cocoon shell weight	茧层率(%) Cocoon layer rate
雌 Female	0 (CK)	1.873 ± 0.014	0.431 ± 0.043	23.019
	50	1.665 ± 0.088 **	0.358 ± 0.056	21.596
	100	1.437 ± 0.071 **	0.273 ± 0.020 **	19.133
	200	1.382 ± 0.204 **	0.260 ± 0.013 **	18.809 **
雄 Male	0 (CK)	1.416 ± 0.062	0.382 ± 0.027	27.003
	50	1.205 ± 0.024	0.316 ± 0.014 *	26.210
	100	1.151 ± 0.150 *	0.271 ± 0.022 **	23.553 *
	200	1.213 ± 0.031 **	0.250 ± 0.058 **	23.030 **

表中数据为平均值 ± *SD*（n = 3）；星号和双星号分别表示与对照（清水）差异显著（$P<0.05$）和极显著（$P<0.01$）（*t* 检验）。Data in the figure are mean ± *SD* (n = 3). The asterisk and double asterisk indicate significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) from the control (water), respectively (*t*-test).

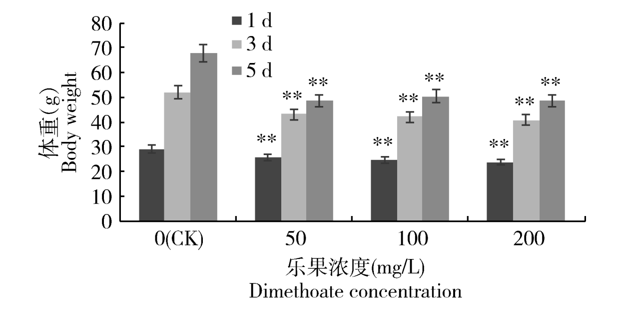


图 1 乐果对家蚕 5 龄幼虫体重的影响

Fig. 1 Effect of dimethoate on the body weight of the 5th instar larvae of *Bombyx mori*

图中数据为平均值 ± 标准差（n = 3）；柱上星号和双星号分别表示与对照（清水）差异显著（$P<0.05$）和极显著（$P<0.01$）（*t* 检验）。图 2 – 5 同。Data in the figure are mean ± *SD* (n = 3). The asterisk and double asterisk above bars indicate significant difference ($P<0.05$) and extremely significant difference ($P<0.01$) from the control (water), respectively (*t*-test). The same for Figs. 2 – 5.

2.2 乐果处理后在家蚕生殖腺中的残留浓度

自家蚕 5 龄眠起用不同浓度乐果处理 5 龄第 5 天幼虫和羽化后的成虫，分别测定生殖腺中的乐果残留浓度。结果表明（图 2）：相比对照组，在幼虫期，50 ~ 200 mg/L 处理组雌、雄幼虫生殖腺中的乐果残留浓度相比对照组有极显著上升（$P<0.01$）；在成虫期，成虫生殖腺中乐果残留浓度在 50 和 200 mg/L 处理组中呈现极显著性上升（$P<0.01$），在 100 mg/L 处理组呈现显著性上升（$P<0.05$）。成

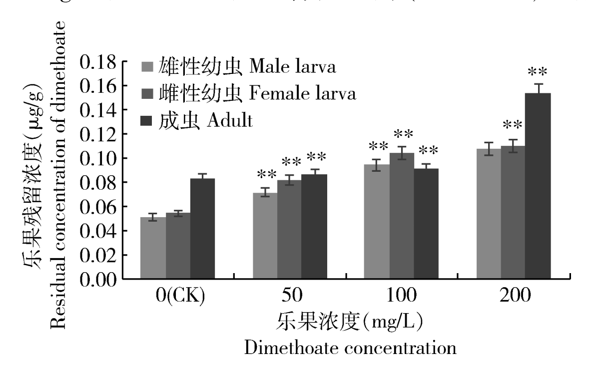


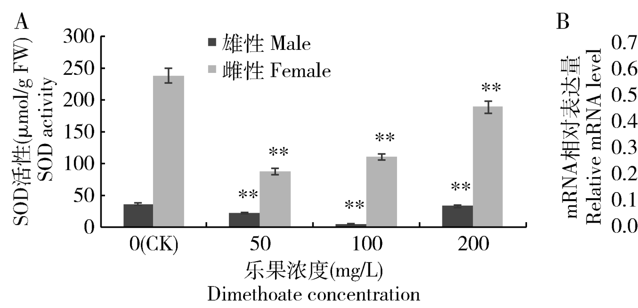
图 2 在不同浓度乐果处理后家蚕 5 龄第 5 天幼虫和成虫生殖腺中的乐果残留浓度

Fig. 2 Residual concentration of dimethoate in gonads of the 5th instar larvae and adults of *Bombyx mori* after treatment with different concentrations of dimethoate

虫生殖腺中的乐果含量与幼虫期的变化趋势相似，均表现出剂量-效应关系。

2.3　农药对家蚕生殖腺中 SOD 酶活性及其 mRNA 表达的影响

SOD 能清除超氧阴离子自由基(O_2^-)，对机体的氧化与抗氧化平衡至关重要。从图 3 可见，添食乐果后，试验组家蚕幼虫生殖腺中 SOD 酶活力相比对照组都呈显著性下降趋势(图3：A)。在 50~200 mg/L 处理浓度下，雄蚕生殖腺中 SOD 活性(图 3：A)以及相应的 *sod* 基因 mRNA 表达水平均呈现极显著性下降($P<0.01$)(图 3：B)。在 50~200 mg/L 处理浓度下，雌蚕生殖腺中 SOD 活性呈极显著性下降($P<0.01$)，而相应的 *sod* 基因 mRNA 表达水平在 50 mg/L 处理组与对照之间呈现极显著性差异($P<0.01$)，在 100 mg/L 处理组与对照之间呈显著性差异($P<0.05$)，200 mg/L 处理组与对照相比无显著差异($P>0.05$)。由此可见，在 5 龄幼虫生殖腺中，SOD 活性随处理浓度的增加而呈现的变化趋势有很大的差异，且乐果胁迫对家蚕雄性幼虫 *sod* 基因的 mRNA 水平影响较对雌性更大。生殖腺不是家蚕主要的解毒器官，因而较易受到有害物质的损伤，可能没有足够能力及时清除乐果胁迫产生的超氧阴离子，进而损伤组织和细胞，影响家蚕的正常生理活动。



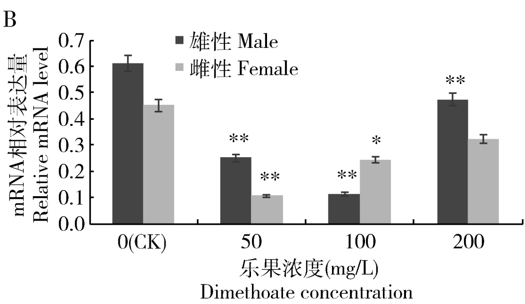


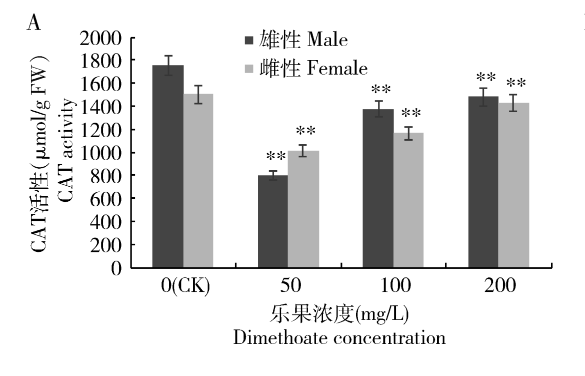
图 3　乐果对家蚕 5 龄幼虫生殖腺 SOD 活性(A)及其 mRNA 表达水平(B)的影响

Fig. 3　Effect of dimethoate on SOD activity (A) and its mRNA expression level (B) in gonads of the 5th instar larvae of *Bombyx mori*

基因相对表达量以对照(清水)中的表达量为基准。The relative expression level of gene was normalized to that in the control (water). 图 4 同 The same for Fig. 4.

2.4　乐果对家蚕生殖腺中过氧化氢酶(CAT)活性及其 mRNA 表达的影响

CAT 能迅速分解细胞代谢中产生的 H_2O_2，从而清除自由基，SOD 和 CAT 构成了应对外界胁迫的第一道防线，CAT 是清除 H_2O_2 的主要酶，因此测定 CAT 活性是了解机体自由基清除能力的重要手段之一。如图 4(A)所示，较对照组，在 50~200 mg/L 乐果暴露浓度下，雌、雄家蚕生殖腺中 CAT 活性都呈极显著下降($P<0.01$)，这与图 3(A)所示生殖腺 SOD 活性变化相似，体现了 SOD 和 CAT 作为保护酶系统成员的协同性。图 4(B)中，生殖腺中 *cat* 基因的 mRNA 水平随着乐果处理浓度的升高，出现了



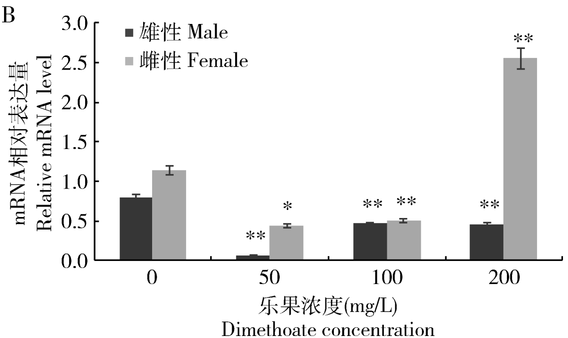


图 4　乐果对家蚕 5 龄幼虫生殖腺 CAT 酶活性(A)及其 mRNA 表达水平(B)的影响

Fig. 4　Effect of dimethoate on CAT activity (A) and its mRNA expression level (B) in gonads of the 5th instar larvae of *Bombyx mori*

先抑制后诱导的变化。较于对照组，50 ~ 200 mg/L 处理组中雄蚕 *cat* 基因的 mRNA 水平极显著降低（$P < 0.01$）；雌蚕在 50 和 200 mg/L 组 *cat* 基因的 mRNA 水平极显著降低（$P < 0.01$），而在 100 mg/L 处理组呈显著性降低（$P < 0.05$）。在 200 mg/L 浓度处理下，雌蚕 *cat* 基因的 mRNA 水平表现为极显著性上调（$P < 0.01$），而雄蚕中则表现为极显著下调（$P < 0.01$）。雌性家蚕结果显示，与图 3（B）生殖腺中 *sod* 基因的 mRNA 水平受乐果胁迫后完全抑制不同，一定浓度的乐果胁迫下，在生殖腺中 CAT 活性激活系统受到影响时，能够动员基因的表达，产生新的酶蛋白以缓解乐果胁迫对生殖细胞的危害。

2.5　乐果对家蚕生殖腺中 H_2O_2 含量的影响

H_2O_2 是细胞氧化损伤的一个重要检测指标。从图 5 可看出，正常家蚕生殖腺中 H_2O_2 含量为 7.737 ~ 18.395 μmol/g FW，表明正常蚕体内也存在一定的脂质过氧化作用。较对照组，添食浸药桑叶后，雌雄家蚕生殖腺中的 H_2O_2 含量表现较为相似，随乐果浓度的增加逐渐升高，但在 50 mg/L 浓度添食下，雌雄家蚕生殖腺中 H_2O_2 含量下降，且与对照相比都存在极显著性差异（$P < 0.01$）；在 100 ~ 200 mg/L 浓度添食下，雌雄家蚕生殖腺中 H_2O_2 含量都出现上升，且与对照相比都存在极显著性差异（$P < 0.01$），在 200 mg/L 浓度添食下，雌雄家蚕生殖腺中 H_2O_2 含量与对照组相比分别上升了 33.54% 和 20.61%。

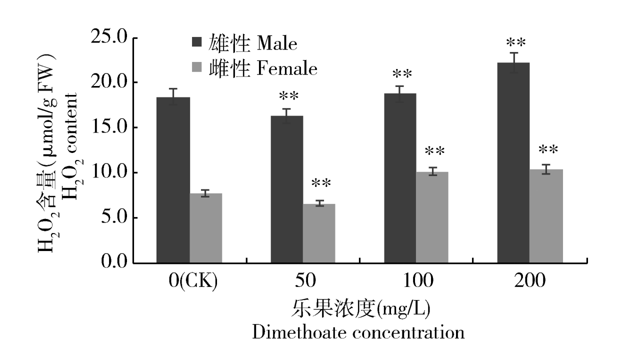


图 5　乐果对家蚕 5 龄幼虫生殖腺 H_2O_2 含量的影响

Fig. 5　Effect of dimethoate on H_2O_2 content in gonads of the 5th instar larvae of *Bombyx mori*

2.6　乐果对家蚕生殖腺组织形态的影响

取 5 龄雄性幼虫性腺进行组织切片，HE 染色能将细胞核染为蓝紫色，细胞质染成粉红色。乐果对家蚕精巢组织结构的影响如图 6 所示。对照组中雄家蚕性腺外膜中细胞结构完整，精巢内膜向内延伸形成 3 片隔膜，将精巢分成 4 个较为均一的精巢胞，各精巢胞间的界限比较明显，精巢胞中细胞排列整齐，细胞之间的界限明显，有精子束的出现。较于对照组，乐果处理后性腺发育明显滞后，随乐果处理浓度的增加，精巢及各睾丸胞的体积逐渐变小，睾丸外膜变稀疏，出现空泡，且有破损，高浓度处理组精子束出现畸变，精细胞数目减少，部分细胞解体，腔内出现碎片，结构损伤严重，结构模糊。

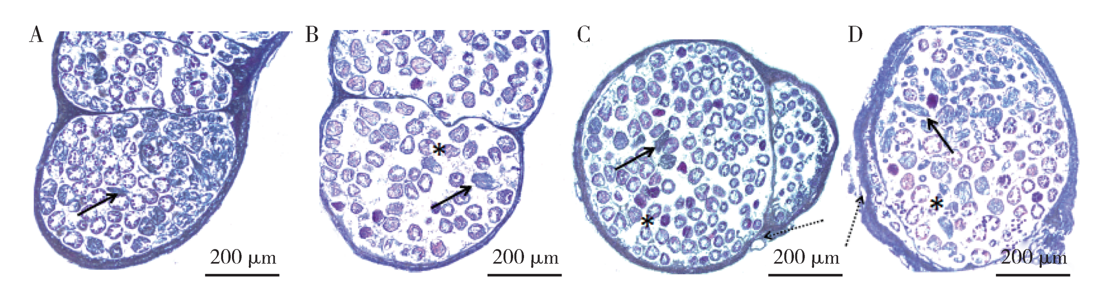


图 6　不同浓度乐果处理后的家蚕 5 龄幼虫精巢的组织切片（HE 染色）

Fig. 6　Testis tissue sections of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* fed with different concentrations of dimethoate（H&E staining）

A – D：分别依次表示 0（CK），100，200 和 400 mg/L 乐果处理后的精巢切片图 Images of the testicular section after treatment with 0（control），100，200 and 400 mg/L dimethoate，respectively. 对照组表现出精巢胞中细胞排列整齐，细胞之间的界限明显，有精子束的出现；100 mg/L 乐果处理组出现损坏的精母细胞；200 mg/L 乐果处理组出现空泡，且细胞数目和体积减少；400 mg/L 乐果处理组出现较多损坏的精母细胞和空泡，且细胞数目和体积减少明显。实线箭头表示的是精子束，星号表示的是损坏的精母细胞，虚线箭头表示空泡。Cells in the spermatocyte were arranged neatly，the boundary between cells was obvious，and sperm bundles appeared in the control group；damaged sperm cells appeared in the 100 mg/L dimethoate treatment group；vacuoles appeared and the number and volume of cells decreased in the 200 mg/L dimethoate treatment group；more damaged sperm cells and vacuoles appeared，and the number and volume of cells decreased significantly in the 400 mg/L dimethoate treatment group. The solid arrows indicate sperm bundle，the asterisk indicates damaged spermatocyte，and the dashed arrow indicates vacuoles.

卵巢的组织学切片如图 7 所示，对照组卵巢中的卵细胞排列较整齐，且均匀分布于卵巢中。乐果处理后卵巢形态发生明显变化，外膜处现空泡或凹陷，卵细胞分布不均且卵细胞较少。随着乐果浓度的增大，卵巢中细胞数目出现相对减少，细胞间出现空泡。

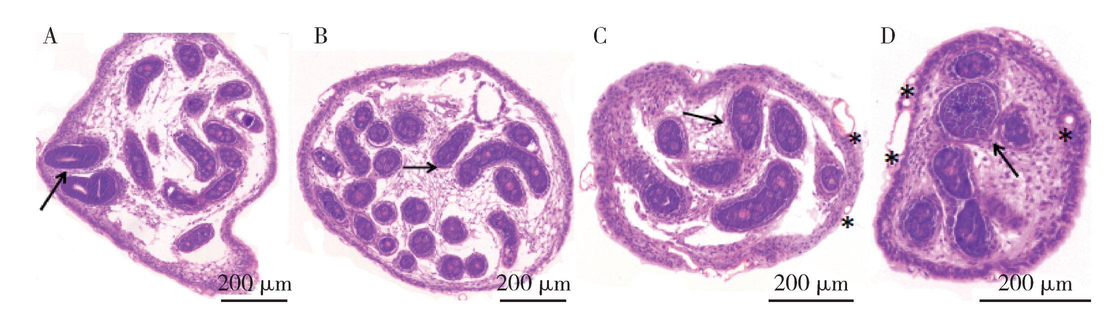


图 7 不同浓度乐果处理后的家蚕 5 龄幼虫卵巢的组织切片(HE 染色)

Fig. 7 Tissue sections of ovary of the 5th instar larvae of *Bombyx mori* after treatment with different concentrations of dimethoate (H&E staining)

A－D: 依次表示 0(CK), 100, 200 和 400 mg/L 浓度处理后的卵巢切片图 Images of the ovary section after treatment with 0 (control), 100, 200 and 400 mg/L dimethoate, respectively. 对照组表现出卵细胞排列较整齐,且均匀分布于卵巢中;100 mg/L 乐果处理组较对照组变化不明显;200 mg/L 乐果处理组出现空泡以及凹陷;400 mg/L 乐果处理组出现空泡增多,且细胞数目减少。实线箭头表示的是卵母细胞,星号表示的是空泡。In the control group, the oocytes were arranged neatly and distributed evenly in the ovary. In the 100 mg/L dimethoate treatment group, no obvious change occurred as compared with the control group. In the 200 mg/L dimethoate treatment group, vacuoles and depressions appeared. In the 400 mg/L dimethoate treatment group, more vacuoles and fewer cells appeared. The solid arrow indicates the oocyte, and the asterisk indicates the bubble.

2.7 乐果对家蚕雄性生殖腺细胞体外培养的影响

为评估乐果对家蚕雄性生殖细胞发育的影响,本研究采用了乐果处理体外培养的生精囊的方法。正常的生精囊在体外培养过程中,能够完成从精原细胞到成熟精子的全部发育过程。图 8 结果显示乐果处理后 4 d 取出精巢,然后在体外培养 24, 48 和 72 h 生精囊的形态。培养 24 h 后,观察到对照组中的生精囊细胞排列整齐,都有成熟精子束形成,很少出现典型发育不良的生精囊。而乐果处理组出现不能发育和发育不良甚至萎缩和坏死的生精囊,且随浓度的增加逐渐增多。培养 48 和 72 h 后,显示经过处理后,即使脱离乐果的环境,对后期生精囊的发育也有显著不良影响。随着乐果浓度的增加,精子束的致畸率越高,对家蚕的生殖腺的影响也越大。乐果浓度为 400 mg/L 时,生精囊中的精子束相比对照组形态发生了变异,表明生精囊的发育出现致畸现象。

3 讨论与结论

有机磷农药乐果通常用于控制农产品和果树中的昆虫,但在实际生产过程中,该农药在使用中常由不当操作致农药在植物中残留(He *et al.*, 2018)。在先前的报道中,比如蜗牛 *Helix aspersa* (Coeurdassier *et al.*, 2010)、鲤鱼 *Cyprinus carpio* (Fazilat *et al.*, 2017; Shadegan and Banaee, 2018)、小鼠(李敏等, 2002; 何华等, 2004)已经证明乐果毒性的存在。乐果处理后,可以看到蜗牛代谢紊乱、生殖障碍和生理生化参数的一些变化(Tripathi and Singh, 2003a, 2003b)。乐果对西方蜜蜂 *Apis mellifera* 幼虫的存活率、发育速率和幼虫重量等生理指标都有不良的影响(Dai *et al.*, 2018)。近年来,有机磷农药对动物的生殖毒性研究已成热门。在本研究中,我们选择家蚕作为一种动物实验模型来评估乐果对昆虫的生殖毒性,结果表明乐果对家蚕生殖腺发育有显著影响。

本研究结果表明,乐果处理 5 龄眠起幼虫后,在 5 龄第 5 天幼虫和成虫的生殖腺中都检测到乐果残留,且卵巢中的含量高于精巢。Shi 等(2018)通过研究表明乐果通过 $-CH_3$ 基团(在 $-NHCH_3$ 基团中)和通过 OH^- 加合物产生毒性更强的氧化乐果,进而达到杀虫作用。这表明乐果可以通过不同的该途径积聚在家蚕的精巢和卵巢中。

在这项研究中,乐果处理后生殖腺中 SOD 酶活性随处理浓度的增加而呈现不同的变化趋势,且乐果胁迫对家蚕雄性 *sod* 基因的 mRNA 水平影响较雌性大。生殖腺对乐果的毒害抵抗性弱,在乐果处理组酶活性和 *sod* 基因 mRNA 水平的表达都呈下降趋势,可能没有足够能力及时清除乐果胁迫产生的超氧阴离子,进而损伤组织和细胞,影响家蚕的正常生理活动。Shadegan 和 Banaee(2018)研究表明,乐果处理鲤鱼后体内的 CAT 活性也显著增加。而我们的结果表明家蚕生殖腺中 CAT 活性在受到乐果处理后却出现下降趋势,雌蚕生殖腺中 *sod* 基因的 mRNA 水平受乐果胁迫后完全受抑。该结果与 Singh 和 Prasad(2008)的结果基本一致。

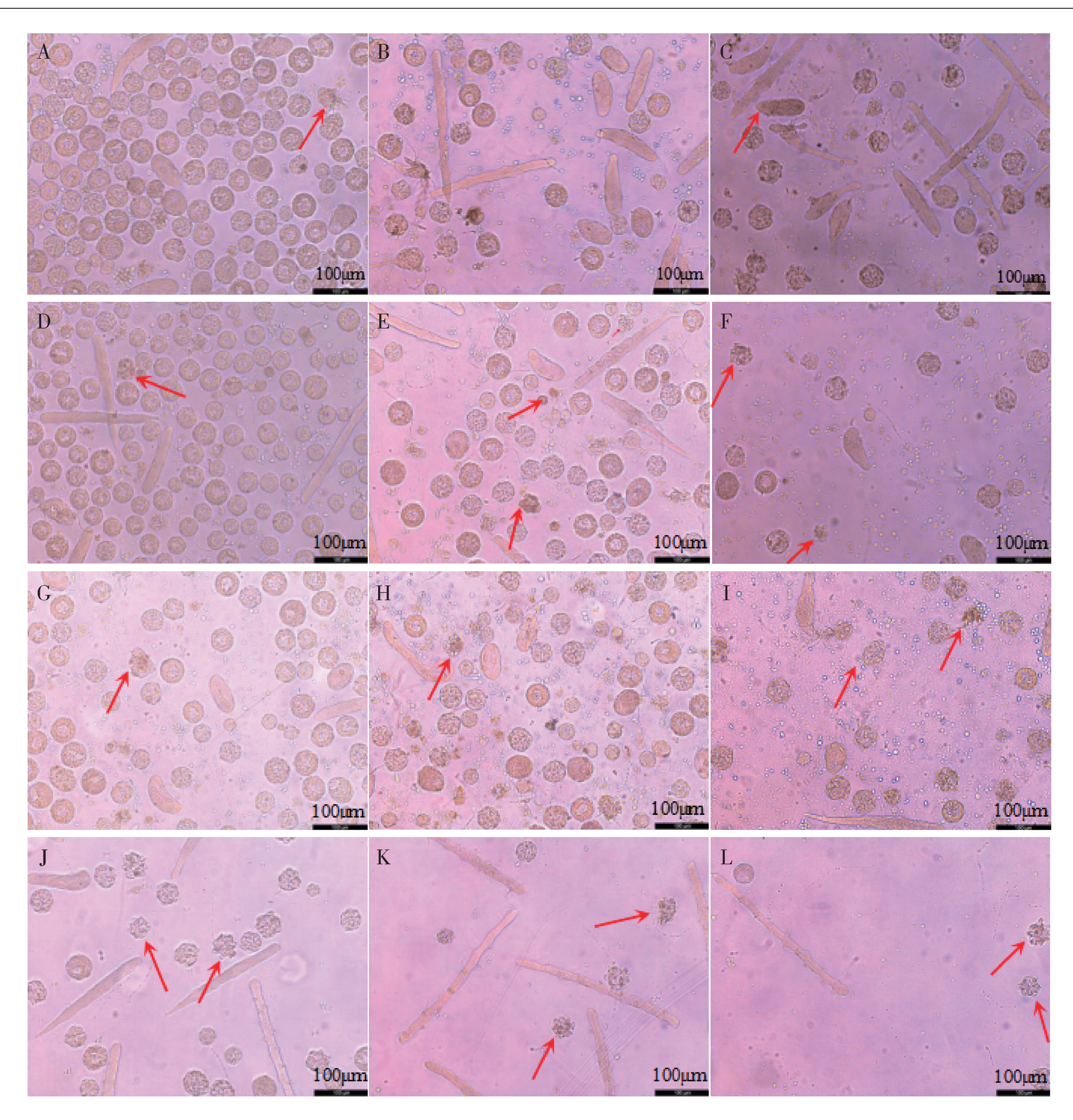


图 8　乐果处理后家蚕生精囊离体培养发育状态

Fig. 8　Developmental status of seminal vesicles of *Bombyx mori in vitro* after treatment with dimethoate

A－C：分别表示对照组中生精囊离体培养 24，48 和 72 h 图，对照组中生精囊细胞排列整齐，都有成熟精子束形成，很少出现典型发育不良的生精囊 Images of the seminal vesicles at 24，48 and 72 h after *in vitro* culture in the control，respectively. In the control group，seminal vesicle cells were arranged neatly，mature sperm bundles were formed，and typical dysplasia of seminal vesicle was rare. D－F：分别表示 100 mg/L 乐果处理组中生精囊离体培养 24，48 和 72 h 图，出现发育不良甚至萎缩的生精囊 Images of the seminal vesicles at 24，48 and 72 h after *in vitro* culture in the treatment group with 100 mg/L dimethoate，respectively. Dysplasia and even atrophy of seminiferous vesicles appeared in this treatment group. G－I：分别表示 200 mg/L 乐果处理组中生精囊离体培养 24，48 和 72 h 图，出现发育不良甚至萎缩和坏死的生精囊增多，且细胞数目减少 Images of the seminal vesicles at 24，48 and 72 h after *in vitro* culture in the treatment group with 200 mg/L dimethoate，respectively. In this treatment group，dysplasia，atrophy and necrosis of seminiferous vesicles increased，and the number of cells decreased. J－L：分别表示 400 mg/L 乐果处理组中生精囊离体培养 24，48 和 72 h 图，出现大量萎缩和坏死的生精囊，且精子束畸形 Images of the seminal vesicles at 24，48 and 72 h after *in vitro* culture in the treatment group with 400 mg/L dimethoate，respectively. A large number of atrophic and necrotic seminiferous vesicles and abnormal sperm bundles appeared in this treatment group. 实线箭头表示的是受损细胞。The solid arrow indicates the damaged cells.

精巢是研究农药对雄性生殖毒性的常用指标（刘衍忠等，2011）。长期接触农药会引起生殖系统组织病理学和细胞病理学改变，导致精子数量和活力降低（Blanco-Munoz *et al*.，2010）。Akhtar 等（2009）发现毒死蜱使大鼠睾丸及附睾重量减轻，推断是由于降低了雄激素分泌水平，减少了睾丸和睾丸糖原的唾液酸含量，诱发睾丸损伤。通过家蚕精巢组织切片和生精囊离体培养观察显示，乐果能降

低家蚕生精囊细胞数目,精细胞碎片增多,随着浓度和时间的增加,乐果能显著降低家蚕精细胞的质量,且精子出现畸形现象,这与 Jorsaraei 等(2009)和 Dirican 和 Kalender(2011)研究的农药二嗪磷和敌敌畏对大鼠睾丸的影响的结果一致。卵巢的主要表象为周期性地排卵及相应激素水平、阴道上皮细胞的周期性变化。本研究结果中,乐果处理后导致家蚕卵细胞减少且发生致畸现象,包括空泡现象。Mahadevaswam 和 Kaliwal(2002)研究表明乐果能显著降低卵巢的重量,Rao 和 Kaliwal(2002)以及 Dutta 和 Maxwell(2003)的报告显示卵巢的显微结构呈退行性改变,闭锁卵母细胞显著增多,表明乐果对生殖功能有不良影响。有机磷能够显著降低卵巢细胞浆和细胞膜的结合蛋白、总脂、磷酸酯和胆固醇的浓度,卵巢呈现衰退性变化(Kaur and Dhanju, 2005)。Cukurcam 等(2004)显示,高浓度有机磷处理诱导卵子发生过程中减数分裂Ⅰ染色体不分离,而低浓度则引起减数分裂Ⅱ染色单体分离错误,导致卵母细胞异倍体。Martínez-Morcillo 等(2019)报告研究表明乐果会降低细胞活性。依据这些文献报道推测,本试验中有机磷农药对家蚕卵巢组织的毒性作用可能是直接对卵巢产生毒性或通过干扰虫体发育的激素水平,诱导卵巢器官发生衰退性变化。

在本研究试验条件下,有机磷农药乐果对家蚕生殖腺有显著毒理损伤影响,主要表现为对生殖器官和生殖腺酶活力的影响,生殖腺中的抗氧化酶(SOD 和 CAT)活性及其相关基因的 mRNA 水平以及 H_2O_2 水平发生改变。

自 2017 年起,国家相关部门撤销乐果(包括该农药有效成分的单剂、复配制剂)的农药登记,不再受理以及批准乐果用于蔬菜、瓜果等农药登记申请。但是有机磷农药乐果并没有得到全面禁止。本研究初步研究了乐果处理 5 龄眠起在家蚕幼虫体内残留对生殖腺的毒理影响,可为进一步加强全面禁止大田喷洒有机磷乐果农药和对间作桑园影响家蚕发育的安全性评估提供试验依据。

参考文献(References)

Abdalah FB, Slima AB, Dammak I, Keskes-Ammar L, Mallek Z, 2010. Comparative effects of dimethoate and deltamethrin on reproductive system in male mice. *Andrologia*, 42(3): 182–186.

Akhtar N, Srivastava MK, Raizada RB, 2009. Assessment of chlorpyrifos toxicity on certain organs in rat, *Rattus norvegicus*. *J. Environ. Biol.*, 30(6): 1047–1053.

Blanco-Munoz J, Morales MM, Lacasana M, Aguilar-Garduno C, Bassol S, Cebrian ME, 2010. Exposure to organophosphate pesticides and male hormone profile in floriculturist of the state of Morelos, Mexico. *Hum. Reprod.*, 25(7): 1787–1795.

Chen JQ, Wang ZL, Li GP, Guo RX, 2012. The effect of dimethoate on the reproduction of freshwater rotier. *Ecol. Environ. Sci.*, 21(10): 1731–1736. [陈建秋, 王志良, 李国平, 郭瑞昕, 2012. 有机磷农药乐果对萼花臂尾轮虫生殖的影响. 生态环境学, 21(10): 1731–1736]

Coeurdassier M, Saint-Denis M, Gomot-De Vaufleury A, Ribera D, Badot PM, 2010. The garden snail (*Helix aspersa*) as a bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth, and acetylcholinesterase activity. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20(9): 1951–1957.

Cukurcam S, Sun F, Betzendahl I, Adler ID, Eichenlaub-Ritter U, 2004. Trichlorfon predisposes to aneuploidy and interferes with spindle formation in in vitro maturing mouse oocytes. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ.*, 564(2): 165–178.

Dai P, Jack CJ, Mortensen AN, Bustamante TA, Bloomquist JR, Ellis JD, 2018. Chronic toxicity of clothianidin, imidacloprid, chlorpyrifos, and dimethoate to *Apis mellifera* L. larvae reared *in vitro*. *Pest Manag. Sci.*, 75(1): 29–36.

Dirican EK, Kalender Y, 2011. Dichlorvos-induced testicular toxicity in male rats and the protective role of vitamins C and E. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 64(7): 821–830.

Dutta HM, Maxwell LB, 2003. Histological examination of sublethal effects of diazinon on ovary of bluegill, *Lepomis macrochirus*. *Environ. Pollut.*, 121(1): 95–102.

Fazilat N, Vazirzadeh A, Banaee M, Farhadi A, 2017. Separate and combined effects of dimethoate pesticide and bio-fertilizer on the activity of enzymes involved in anaerobic pathway, neurotransmission and protein metabolism in common carp, *Cyprinus carpio* (Teleostei: Cyprinidae). *Iran. J. Ichthyol.*, 4(4): 352–360.

He H, Bu XY, Hao JG, 2004. Experimental study on the joint reproductive toxicity of commonly used pesticides dimethoate and trichlorfon on rats. *End. Dis. Not.*, 19(3): 21–24. [何华, 卜新莹, 郝敬贡, 2004. 常用农药乐果、敌百虫对大鼠的联合生殖毒性实验研究. 地方病通报, 19(3): 21–24]

He J, Zhou L, Yao Q, Liu B, Xu H, Huang J, 2018. Greenhouse and field-based studies on the distribution of dimethoate in cotton and its effect on *Tetranychus urticae* by drip irrigation. *Pest Manag. Sci.*, 74(1): 225–233.

Jorsaraei S, Firoozjaee A, Sarabi E, Marzoni ET, Pasha YY, 2009. UP-2.043: Histopathological effects of single dose treatment of diazinon on testis structure in rats. *Urology*, 74(4): S245–S245.

Kaur S, Dhanju CK, 2005. Biochemical effects of some organophosphorus pesticides on the ovaries of albino rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 49(2): 148–152.

Li HY, Huang WJ, Xie JL, Qin BQ, Wei RJ, 2010. Three organophosphate insecticides on mulberry thrips control and their residual toxicities on silkworm. *Agrochemicals*, 49(9): 677–678. [李华英, 黄文九, 谢锦灵, 覃宝勤, 韦日健, 2010. 3 种有机磷杀虫剂防治桑树蓟马效果及对家蚕的残毒期. 农药, 49(9):

677 – 678］

Li M, Shen ZL, Wang BS, Guo JS, 2002. Dietary fat on the procreation of male rats induced by dimethoate. *J. Hyg. Res.*, 31(1): 58 – 59, 61.［李敏，沈志雷，王炳森，郭俊生，2002. 膳食脂肪含量对乐果致雄性大鼠生殖毒性的影响. 卫生研究，31(1): 58 – 59, 61］

Liu Y, Chen YJ, 2016. Organophosphorus pesticide dimethoate experimental study on toxicity of hornwort. *J. Cap. Norm. Univ. (Nat. Sci. Ed.)*, 37(2): 55 – 59.［刘洋，陈永娟，2016. 金鱼藻在有机磷农药乐果污染水体的抗逆性. 首都师范大学学报(自然科学版)，37(2): 55 – 59］

Liu YZ, Li LB, Li XX, Xie L, Han MM, Sai LL, 2011. Effects of chlorpyrifos on spermatogenesis function and enzymatic activity in male rats. *J. Environ. Health*, 28(4): 311 – 331.［刘衍忠，李兰波，李相鑫，谢林，韩明明，赛林霖，2011. 毒死蜱对大鼠生精功能和睾丸组织酶活力的影响. 环境与健康杂志，28(4): 311 – 313］

Lü LL, Zhu DD, Dong XX, 2014. Effects of environment hormone dimethoate on the reproduction of *Brachionus calyciflorus*. *J. Agro-Environ. Sci.*, 33(1): 57 – 62.［吕林兰，朱丹丹，董学兴，2014. 环境激素乐果对萼花臂尾轮虫生殖的影响. 农业环境科学学报，33(1): 57 – 62］

Lu ZF, Wu QF, Guo RL, 2015. Analysis of organophosphorus pesticide residues in wheat grains in Anyang region. *Shanghai Veg.*, (3): 15 – 17.［路志芳，吴秋芳，郭瑞林，2015. 安阳地区小麦籽粒中有机磷农药残留分析. 上海蔬菜，(3): 15 – 17］

Mahadevaswami MP, Kaliwal BB, 2002. Effect of dimethoate administration schedules on compensatory ovarian hypertrophy, follicular dynamics, and estrous cycle in hemicastrated mice. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, 13(3): 225 – 248.

Martínez-Morcillo S, Pérez-López M, Soler-Rodríguez F, González A, 2019. The organophosphorus pesticide dimethoate decreases cell viability and induces changes in different biochemical parameters of rat pancreatic stellate cells. *Toxicol. Vitro.*, 54: 89 – 97.

Qin ML, Li GL, Su X, Du X, Jiang JF, 2017. Determination of dimethoate in mulberry by UPLC-MS/MS. *Guangzhou Chem. Ind.*, 45(23): 113 – 116.［覃明丽，李国烈，苏旭，杜鑫，蒋金芳，2017. 超高效液相色谱-串联质谱法测定桑葚中乐果残留. 广州化工，45(23): 113 – 116］

Rao RP, Kaliwal BB, 2002. Monocrotophos induced dysfunction on estrous cycle and follicular development in mice. *Ind. Health*, 40(3): 237 – 244.

Shadegan MR, Banaee M, 2018. Effects of dimethoate alone and in combination with Bacilar fertilizer on oxidative stress in common carp, *Cyprinus carpio*. *Chemosphere*, 208: 101 – 107.

Shi X, Zhang R, Li Y, Zhang Q, Xu X, Wang W, 2018. Mechanism theoretical study on OH-initiated atmospheric oxidation degradation of dimethoate. *J. Mol. Struct.*, 1163(2): 61 – 67.

Singh P, Prasad SM, 2008. Antioxidant enzyme responses to the oxidative stress due to chlorpyrifos, dimethoate and dieldrin stress in palak (*Spinacia oleracea* L.) and their toxicity alleviation by soil amendments in tropical croplands. *Sci. Total Environ.*, 630: 839 – 848.

Tang WC, Xiao YY, Yang CF, Guo DD, Zhu Y, 2016. Reproductive damage and oxidative stress caused by fluoride in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomol. Sin.*, 59(12): 1308 – 1316.［唐文超，肖媛媛，杨成飞，郭东东，朱勇，2016. 氟化物导致的家蚕生殖损伤及氧化应激反应. 昆虫学报，59(12): 1308 – 1316］

Tripathi PK, Singh A, 2003a. Toxic effects of dimethoate and carbaryl pesticides on protein metabolism of the freshwater snail *Lymnaea acuminata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 70(1): 146 – 152.

Tripathi PK, Singh A, 2003b. Toxic effects of dimethoate and carbaryl pesticides on reproduction and related enzymes of the freshwater snail *Lymnaea acuminata*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 71(3): 535 – 542.

Tu XY, Wei SC, Zhang JC, Liu XW, 2000. Rescue analysis of 45 cases of intermediate syndrome of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Emerg. Med.*, 9(4): 251.［涂向阳，魏世超，张建川，刘雄文，2000. 急性有机磷农药中毒中间综合征 45 例抢救分析. 急诊医学，9(4): 251］

Valenzuela-Harrington M, Castillo I, Díaz C, Alés I, Rodriguez-Moreno A, 2012. Dimethoate accelerates the extinction of eyeblink conditioning in mice. *Neurotoxicology*, 33(1): 105 – 110.

Wang CH, Li CP, He M, 2015. Effects of dimethoate on life-cycle traits of *Caenorhabditis elegans*. *Asian J. Ecotoxicol.*, 10(2): 332 – 337.［王春花，李朝品，何梅，2015. 乐果对秀丽隐杆线虫生活史特征的影响. 生态毒理学报，10(2): 332 – 337］

Wang M, 2017. Pathological observation of dimethoate-induced hepatorenal injury in mice. *J. Qiannan Med. Coll. Nation.*, 30(4): 242 – 245.［汪敏，2017. 乐果对小鼠肝肾损伤的病理学观察. 黔南民族医专学报，30(4): 242 – 245］

Wang SM, Hu Y, Xu ZX, 2016. Flow injection chemiluminescence method for detection of dimethoate content in vegetables. *J. Food Sci. Tech.*, 34(6): 75 – 78.［王守敏，胡燕，徐志祥，2016. 流动注射化学发光法检测蔬菜中乐果含量. 食品科学技术学报，34(6): 75 – 78］

Wang XQ, Wang XY, Ma Y, Yang JL, Wang ZW, Qi FF, Liu ZW, Wang Q, 2017. Residual and dissipation of dimethoate and omethoate in *Vigna unguiculata* at different periods of planting. *Chin. J. Pestic. Sci.*, 19(4): 523 – 527.［王新全，王祥云，马莹，杨桂玲，汪志威，齐沛沛，刘之炜，王强，2017. 乐果及其代谢物氧乐果在不同生育期豇豆中的残留消解动态. 农药学学报，19(4): 523 – 527］

Wei BP, Bin RP, Hu C, 2015. Contrast test of efficacy of several pesticides on main pests in mulberry orchards. *Guangxi Seric.*, 52(2): 27 – 32.［韦炳佩，宾荣佩，胡聪，2015. 几种农药对桑园主要害虫的药效对比试验. 广西蚕业，52(2): 27 – 32］

Wilczek G, Rost-Roszkowska M, Wilczek P, Babczyńska A, Szulińska E, Sonakowska L, 2014. Apoptotic and necrotic changes in the midgut glands of the wolf spider *Xerolycosa nemoralis* (Lycosidae) in response to starvation and dimethoate exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 101(1): 157 – 167.

Wu Y, Peng F, Wu B, Li H, Wu RM, Huang SG, 2017. Rapid detection of dimethoate pesticide residues in tea based on SERS technology. *Jiangsu Agric. Sci.*, 45(11): 160 – 163.［吴燕，彭

芳，吴斌，李红，吴瑞梅，黄双根，2017. 基于 SERS 技术的茶叶中乐果农药残留的快速检测. 江苏农业科学，45(11)：160 – 163]

Xiao YC, Lei EC, Guan XJ, Zhou YN, 2016. GC-FPD determination of 12 organophosphorus pesticide residues in vegetables. *J. Liaoning Agric. Tech. Coll.*, 18(1): 1 – 3. [肖彦春，雷恩春，关秀杰，周亚楠，2016. GC-FPD 法测定蔬菜中 12 种有机磷农药残留. 辽宁农业职业技术学院学报，18(1)：1 – 3]

Zhang J, Jia PL, Chen QC, Wang YY, Liang HJ, Zhang HT, 2016. Acute toxicity evaluation of 14 pesticides to silkworm (*Bombyx mori* 9. Fu). *Pestic. Sci. Admin.*, 37(11): 44 – 51. [张晶，贾鹏龙，陈秋初，王叶元，梁慧君，张宏涛，2016. 14 种农药对 9・芙家蚕(*Bombyx mori*)的急性毒性评价. 农药科学与管理，37(11)：44 – 51]

Zhang PP, Wang ZL, Lu Y, Cui YD, Yang JX, 2016. GC-NPD testing content of dimethoate in organophoris. *J. Fuyang Teach. Coll. (Nat. Sci. Ed.)*, 33(2): 46 – 49. [张鹏鹏，王中亮，芦玉，崔亚东，杨京霞，2016. 血清中有机磷农药乐果含量的 GC-NPD 测定法的研究. 阜阳师范学院学报(自然科学版)，33(2)：46 – 49]

(责任编辑：赵利辉)